

Sumo Sumo V.
João Luiz Costa Cardoso Francisco Oscar de Siqueira França
Fan Hui Wen Ceila Maria Sant'Ana Málaque Vidal Haddad Jr.

ANIMAIS PEÇONHENTOS NO BRASIL

BIOLOGIA, CLÍNICA E TERAPÊUTICA
DOS ACIDENTES

sarvier
 FAPESP



32.

Efectos Locales en el Envenenamiento Ofídico en América Latina*

JOSÉ MARÍA GUTIÉRREZ
BRUNO LOMONTE

INTRODUCCION

Los envenenamientos por mordedura de serpiente constituyen un importante problema de salud pública en América Latina¹⁻⁴. La mayoría de estos envenenamientos son causados por mordeduras de serpientes de la familia Viperidae, en tanto un pequeño porcentaje de casos son consecuencia de mordeduras por serpientes coral (género *Micrurus*, familia Elapidae)^{3,4}. Por otra parte, también ocurren accidentes por serpientes de la familia Colubridae, los cuales no cursan con envenenamiento, con algunas excepciones como el caso de la especie *Philodryas olfersii*, cuya mordedura produce algunos efectos locales^{3,5}.

En América Latina, los envenenamientos por vipéridos se caracterizan por una fisiopatología compleja, que incluye efectos locales (mionecrosis, dermonecrosis, hemorragia, edema, dolor) y, en casos moderados y severos, alteraciones sistémicas como coagulopatías, sangrado, choque cardiovascular e insuficiencia renal aguda^{2,4,6}. La principal excepción a este patrón fisiopatológico la constituye el veneno de algunas subespecies de la cascabel sudamericana, especialmente *Crotalus durissus terrificus*, el cual induce alteraciones locales irrelevantes, caracterizándose más bien por potentes actividades neurotóxicas y miotóxicas sistémicas y por alteraciones renales y de la coagulación^{3,7,8}. Por su parte, los venenos de serpientes coral (*Micrurus* sp) y de la serpiente marina *Pelamis platurus* (familia Hydrophiidae) inducen únicamente un efecto neurotóxico sin ocasionar alteraciones locales relevantes desde el punto de vista clíni-

co^{2,4,6,9}. Experimentalmente se ha evidenciado que los venenos de serpientes coral inducen un efecto miotóxico en ratones^{10,11}; sin embargo, este efecto no parece ser importante en envenenamientos humanos.

Los efectos locales inducidos por venenos de vipéridos constituyen un problema relevante por varias razones: 1. se desencadenan muy rápidamente después de inoculado el veneno, lo cual dificulta mucho la neutralización si el antiveneno es administrado varias horas después del accidente. 2. afectan drásticamente el tejido muscular, los vasos sanguíneos y la piel, induciendo lesiones que, con frecuencia, terminan en secuelas. 3. frecuentemente se complican con infecciones, lo cual dificulta aún más el manejo de este cuadro. 4. en un porcentaje de los casos severos se desencadena un síndrome compartimental que obliga a efectuar fasciotomía, complicándose de esta manera el manejo del paciente y prolongándose la estancia hospitalaria. 5. la experiencia clínica muestra que estos efectos locales son difíciles de neutralizar por los antivenenos y por otros recursos terapéuticos complementarios. Los efectos locales constituyen un aspecto muy importante del envenenamiento ofídico por vipéridos en América Latina, por lo que su estudio es de suma importancia en la región. En este capítulo se discute la patogénesis de los efectos locales inducidos por serpientes de la familia Viperidae, así como algunos aspectos sobre su tratamiento y manejo.

HEMORRAGIA

La hemorragia local constituye una de las manifestaciones más frecuentes del envenenamiento por vipéridos en América Latina. En casos

* Segue no final deste capítulo versão em português.

leves este efecto no es muy relevante, pero en casos severos puede ser de gran magnitud, cursando con equimosis y bulas, y originando pérdida importante de sangre. El efecto hemorrágico es causado por un grupo de toxinas, denominadas **toxinas hemorrágicas** o **hemorraginas**, las cuales son enzimas proteolíticas de tipo metaloproteinasas, ya que su actividad enzimática depende de la presencia de un átomo de zinc en su sitio activo¹². Estas enzimas son inhibidas por agentes quelantes tales como el ácido etilendiaminotetracético (EDTA) y la fenantrolina, los cuales secuestran el zinc requerido para la actividad. Tanto la actividad enzimática como la hemorrágica son inhibidas por estos agentes¹²⁻¹⁴.

Los estudios bioquímicos han permitido reconocer cuatro grupos de toxinas hemorrágicas, de acuerdo con sus pesos moleculares y con los dominios que presentan estas toxinas¹². Pese a que el dominio metaloproteinasas tiene similitudes importantes en todas las toxinas hemorrágicas, las marcadas diferencias en el peso molecular se deben a la presencia de dominios adicionales en algunas de ellas (dominio tipodisintegrina, dominio rico en cisteína y dominio tipo lectina)¹².

Cuando se inyectan venenos o toxinas hemorrágicas en animales experimentales es posible estudiar la patogénesis de este efecto. La extravasación aparece, a nivel local, muy rápidamente después de la inyección (Fig. 32.1) y se extiende rápidamente en los tejidos vecinos¹⁵⁻¹⁷. Observaciones histológicas y ultraestructurales señalan claramente que la extravasación ocurre a nivel de la microvasculatura, más precisamente en vasos capilares y en vénulas post-capilares¹⁶⁻¹⁹. Es evidente que no ocurre extravasación en vasos de mayor calibre, pese a que experimentalmente se ha observado otro tipo de lesiones patológicas en arterias y arteriolas, tales como angionecrosis y trombosis²⁰⁻²². La microscopía intravital, empleando el músculo cremáster de ratón, ha permitido observar la dinámica del efecto hemorrágico inducido por el veneno de *Bothrops asper* y por la toxina hemorrágica BaP1 aislada de este veneno. La hemorragia se evidencia mediante eventos de carácter focal y explosivo en los que un grupo grande de eritrocitos sale de los vasos rápidamente, disminuyendo posteriormente la extravasación^{19,23}.

Los estudios ultraestructurales, utilizando el microscopio electrónico de transmisión, han permitido detectar las primeras alteraciones que sufren los capilares, previo a la extravasación. En el caso del veneno de *B. asper* y de la metaloproteinasas hemorrágica BaH1 del mismo vene-

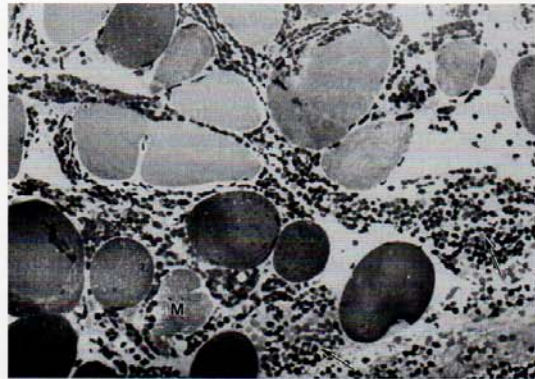


Fig. 32.1 • Histología de un área de tejido muscular de ratón una hora después de la inyección de 50µg de veneno de *Bothrops asper*. Obsérvese la abundante hemorragia en el espacio intersticial (flechas) y algunas fibras musculares necróticas (M).

no, se ha observado que las primeras alteraciones morfológicas consisten en: 1. la formación de vesículas citoplasmáticas o *blebs* que se proyectan hacia el lumen vascular, originando pérdida de material citoplasmático que trae como consecuencia un adelgazamiento de las células endoteliales; y 2. la separación de la célula endotelial de la lámina basal que la rodea, observándose también alteraciones morfológicas en la lámina basal^{16,17}.

La disminución del grosor de las células endoteliales trae como consecuencia la aparición de rupturas o *gaps* en la continuidad de estas células, a través de las cuales ocurre la extravasación. Por otra parte, se ha observado que las uniones intercelulares endoteliales no se afectan como consecuencia de la acción de este veneno y de la metaloproteinasas BaH1^{16,17}. La extravasación ocurre mediante el mecanismo denominado *rexis*¹⁵, es decir, a través de aberturas o lesiones en el interior de las células endoteliales. No se observó hemorragia por el mecanismo de *diapedesis*, o sea, no ocurre salida de eritrocitos a través de uniones intercelulares dilatadas. La patogénesis del efecto hemorrágico inducido por el veneno de *B. asper* y por la toxina hemorrágica BaH1 es muy semejante al descrito para otras toxinas y venenos de la familia Viperidae de los géneros *Crotalus* y *Agkistrodon*^{24,25}. También se ha sugerido que, en la patogénesis del cuadro hemorrágico inducido por el veneno de *B. jararaca* a nivel venular, están involucrados algunos mediadores inflamatorios endógenos, tales como serotonina y mediadores neurohumorales, los cuales contribuyen a la extravasación²⁶.

¿Cuál es el mecanismo de acción de las toxinas hemorrágicas? Aunque esta pregunta no ha sido resuelta satisfactoriamente, los estudios bioquímicos indican que estas metaloproteinasas son capaces de degradar las proteínas que forman la lámina basal de los capilares. Esta estructura de la matrix extracelular está formada por un entramado compuesto por laminina, colágeno tipo IV, nidogen/entactina, fibronectina y por el proteoglicano heparán sulfato. Se ha demostrado que las metaloproteinasas hemorrágicas degradan estas proteínas de matriz *in vitro*^{23,27,28}, lo cual sugiere que también podrían degradar estos componentes *in vivo*. Si ocurre degradación de los componentes de la lámina basal, la interacción entre esta y las células endoteliales se afectaría y el endotelio sufriría diversas alteraciones que culminarían con la formación de rupturas o *gaps* a través de los cuales ocurriría la extravasación. Es importante destacar que la actividad hemorrágica de estas toxinas es totalmente dependiente de la actividad proteolítica.

Existe también la posibilidad de que las toxinas hemorrágicas afecten a la célula endotelial directamente. No obstante, esta hipótesis ha sido refutada por estudios que han demostrado que tanto el veneno crudo de *B. asper*, como las hemorraginas BaH1 y BaP1 de dicho veneno, no afectan la viabilidad de las células endoteliales en cultivo celular^{23,29,30}. El único efecto observado en estas condiciones es un desprendimiento de las células endoteliales de su matriz, posiblemente como consecuencia de la degradación proteolítica de los componentes del sustrato sobre el cual crecen las células. Estas observaciones apoyan la hipótesis de que la lesión endotelial observada *in vivo* es una consecuencia de la degradación de los componentes de la lámina basal y no una acción tóxica directa sobre las células endoteliales, por lo que se ha sugerido que factores de tipo hemodinámico jueguen un papel en la lesión endotelial observada *in vivo*²³.

Pese a que la causa principal del sangrado en envenenamientos por serpientes de la familia Viperidae es la acción descrita de las metaloproteinasas, las alteraciones de la coagulación que caracterizan estos envenenamientos pueden coadyuvar en la hemorragia local y sistémica. La mayoría de los venenos de vipéridos tienen enzimas coagulantes, siendo la más común la enzima tipo-trombina, la cual actúa directamente sobre el fibrinógeno, produciendo microtrombos de fibrina y originando una depleción en los niveles de fibrinógeno con la con-

secuente incoagulabilidad. Esta incoagulabilidad contribuye a la extravasación que se inicia por las lesiones vasculares descritas. En el caso de la metaloproteinasa hemorrágica jararagína, aislada del veneno de *Bothrops jararaca*, se ha demostrado que, además de la degradación de proteínas de la lámina basal, esta toxina afecta también componentes plasmáticos y plaquetarios de la coagulación, contribuyendo así en el sangrado³¹.

La relevancia de las metaloproteinasas en el desarrollo del cuadro patológico local queda evidenciado por el hecho de que algunos inhibidores de estas enzimas, como el agente quelante CaNa₂EDTA y el peptidomimético batmas-tat, reducen de manera significativa la patología local inducida por el veneno de *B. asper*³². Estos resultados sugieren que en el futuro será posible complementar la seroterapia con el uso de inhibidores enzimáticos.

Además de la hemorragia local, los envenenamientos por vipéridos en América Latina se caracterizan por sangrado sistémico, el cual se manifiesta como epistaxis, gingivorragia, hematuria, hematemesia y sangrado en diversos órganos. Este aspecto del envenenamiento ofídico no se incluye en este capítulo.

MIONECROSIS

En los envenenamientos por mordeduras de serpientes de la familia Viperidae se observa, frecuentemente, necrosis del tejido muscular o mionecrosis^{1,2,4,6}. La necrosis muscular, sumada a otras alteraciones locales de tipo vascular, son la causa de secuelas como pérdida de tejido y disfunción de la extremidad mordida. La mionecrosis inducida por estos venenos tiene dos bases fundamentales: 1. La acción directa de toxinas, denominadas miotoxinas, sobre las células musculares, originando lesión celular irreversible, y 2. la isquemia que se desencadena en el tejido muscular como consecuencia del sangrado, la compresión tisular y otras alteraciones inflamatorias, y que también contribuyen a la mionecrosis.

MIONECROSIS INDUCIDA POR MIOTOXINAS

Los venenos de muchas serpientes de los géneros *Bothrops*, *Porthidium*, *Bothriechis* y *Atropoides* (todos los cuales se clasificaban antiguamente en el género *Bothrops*) tienen componentes que afectan directamente las células musculares, denominados **miotoxinas**. Todas las miotoxinas aisladas hasta la fecha de dichos venenos son proteínas básicas, con pesos moleculares de al-

rededor de 15 kDa, y cuyas propiedades estructurales permiten clasificarlas como fosfolipasas A_2 ^{33,34}. Algunas de estas miotoxinas presentan actividad enzimática de fosfolipasa A_2 , en tanto otras, pese a tener estructura de fosfolipasa, carecen de esta actividad enzimática. La causa de este fenómeno se debe a que algunas de estas miotoxinas tienen una sustitución en el residuo 49, presentando lisina en lugar del aspartato, lo cual afecta la capacidad de estas proteínas para ligar calcio y elimina su actividad enzimática. Sin embargo, ambos tipos de fosfolipasas A_2 básicas, las aspartato-49 y las lisina-49, inducen mionecrosis cuando son inyectadas en animales de laboratorio^{33,34}. Además de inducir necrosis muscular, estas miotoxinas tienen otras actividades farmacológicas, ya que son citotóxicas sobre ciertos tipos celulares *in vitro*, inducen edema y algunas tienen acción anticoagulante. Las miotoxinas que han sido mejor caracterizadas son de los venenos de *Bothrops asper*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*, conociéndose la secuencia de aminoácidos de algunas de ellas, así como su estructura cristalina³⁵⁻⁴⁰.

La patogénesis de la necrosis muscular inducida por algunas de estas miotoxinas a nivel experimental ha sido investigada mediante el uso de técnicas histológicas, ultraestructurales y de microscopía intravital. Inicialmente se producen alteraciones pequeñas en la membrana plasmática, generándose lo que se denomina "lesiones delta". Posteriormente las lesiones en la membrana se hacen más grandes. Se observa también hipercontracción de los miofilamentos

(Fig. 32.2) y alteraciones mitocondriales, tales como aumento de volumen mitocondrial, ruptura de las membranas y formación de densidades floculentas, que resultan de la aglomeración de proteínas de la membrana interna de la mitocondria. Los núcleos tienen un aspecto picnótico y las membranas intracelulares (retículo sarcoplásmico y túbulos T) se alteran, con formación de múltiples vesículas en el interior del espacio celular⁴¹⁻⁴³. Las diferentes miotoxinas inducen un patrón similar de alteraciones morfológicas, independientemente de si presentan o no actividad enzimática (Fig. 32.3).

El mecanismo de acción de estas miotoxinas a nivel molecular no se ha dilucidado plenamente. Estudios con liposomas y con células en cultivo indican que estas toxinas son capaces de lesionar directamente la membrana plasmática⁴⁴⁻⁴⁷. Además, observaciones inmunocitoquímicas corroboran que estas miotoxinas se unen a la membrana plasmática de las células musculares y no a estructuras intracelulares⁴⁸. Estos resultados apoyan la hipótesis de que las miotoxinas de *Bothrops* se unen y lesionan la membrana plasmática de la célula muscular como paso fundamental en la necrosis. Dado que hay miotoxinas que carecen de actividad fosfolipasa A_2 , esta alteración de membrana no depende necesariamente de la hidrólisis de fosfolípidos y posiblemente sea más bien consecuencia de la acción de un dominio molecular de las toxinas capaz de penetrar y desorganizar la bicapa lipídica. En el caso de la miotoxina II del veneno de *B. asper*, se ha propuesto que esta región molecular es una porción ubicada en el extremo car-



Fig. 32.2 • Micrografía electrónica de porciones de tres células musculares de ratón 3 horas después de la inyección de 50 µg de la miotoxina I del veneno de *Bothrops asper*. Se observa hipercontracción de miofilamentos (flechas), con aparición simultánea de áreas citoplasmáticas libres de miofilamentos.

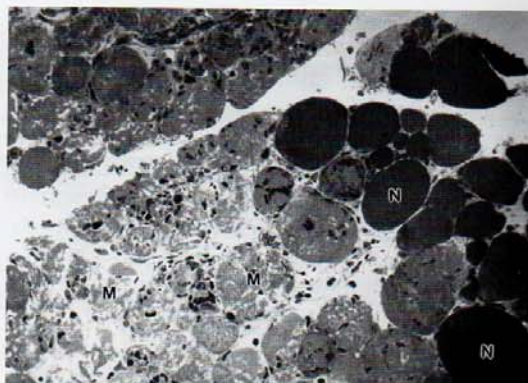


Fig. 32.3 • Área de necrosis en tejido muscular de ratón 24 horas después de la inyección de 50 µg de miotoxina I del veneno de *Bothrops asper*. Se observan abundantes fibras necróticas (M) mezcladas con algunas fibras de apariencia normal (N). Nótese el infiltrado inflamatorio en el espacio intersticial y en el interior de las fibras necróticas.

boxilo terminal de la toxina, rica en aminoácidos básicos e hidrofóbicos⁴⁹. Por otra parte, en las miotoxinas que sí presentan actividad fosfolipasa A₂, se ha propuesto que esta actividad enzimática contribuye a aumentar la alteración de la membrana, ya que la inhibición de la actividad enzimática reduce la extensión de la necrosis muscular^{46,50}.

Una vez que se ha producido la lesión de la membrana plasmática, independientemente del mecanismo por el que se produce esta lesión, las alteraciones celulares y subcelulares subsecuentes son similares para este grupo de miotoxinas. El evento central de la patogénesis del daño celular lo constituye el ingreso masivo del ion calcio, siguiendo el pronunciado gradiente electroquímico que normalmente existe a través de la membrana plasmática (1mM en el fluido extracelular y 0,1µM en el citosol). El ingreso masivo de calcio genera una enorme cantidad de alteraciones celulares, entre las que destacan: 1. hipercontracción de miofilamentos, 2. alteraciones mitocondriales, 3. desregulaciones metabólicas, 4. activación de enzimas proteolíticas dependientes de calcio, 5. activación de fosfolipasas A₂ endógenas, y 6. activación de nucleasas endógenas, entre otras⁵¹. La microscopía intravital de músculo cremaster ha permitido observar las contracturas rápidas del músculo, seguidas de hipercontracciones evidentes¹⁹. En la Fig. 32.4 se resume una hipótesis relativa al mecanismo de acción de las miotoxinas aisladas de venenos botrópicos.

Los eventos descritos ocurren rápidamente después de la inyección de estas miotoxinas, y de los venenos crudos, en ratones de laboratorio. Al igual que la hemorragia, la mionecrosis se observa desde los primeros minutos posteriores al envenenamiento, extendiéndose luego con el transcurso del tiempo. Luego de varias horas se desencadena una reacción inflamatoria celular, con presencia de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos primero y de macrófagos después^{41,52,53}. Estas células son responsables de la remoción del tejido necrótico, paso previo al proceso de regeneración muscular.

Cuando los estudios se han efectuado con miotoxinas purificadas, las cuales inducen mionecrosis pero no causan hemorragia, el proceso de regeneración muscular se desarrolla normalmente y, al cabo de dos semanas, el músculo ha regenerado plenamente, con abundantes células que presentan núcleos en posición central, hallazgo típico de células musculares regenerativas^{43,52}. Por el contrario, cuando los experimentos se han efectuado con venenos totales, que además de afectar las células musculares inducen también hemorragia, la regeneración muscular es sólo parcial e incompleta, observándose muchas regiones con fibrosis y con células regenerativas de tamaño reducido (Fig. 32.5)^{52,54,55}. Se ha propuesto, entonces, que la causa de la deficiente regeneración muscular que se observa en estos envenenamientos resulta de la acción combinada de las miotoxinas (que afectan las células musculares) y de las toxinas hemorrági-

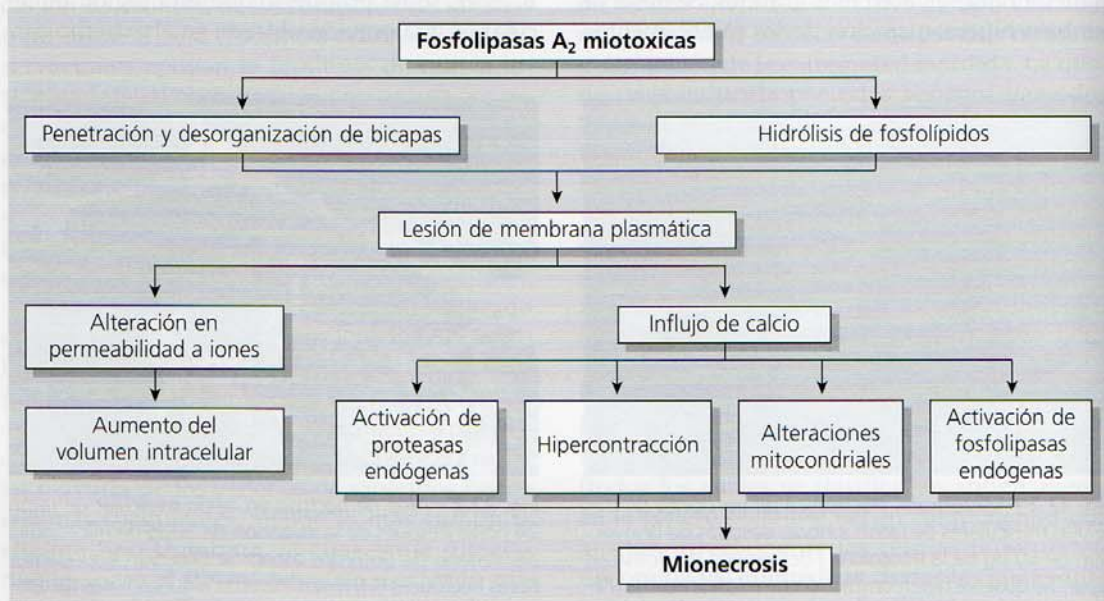


Fig. 32.4 • Hipótesis sobre el mecanismo de acción de las fosfolipasas A₂ miotóxicas de venenos de *Bothrops* sp.

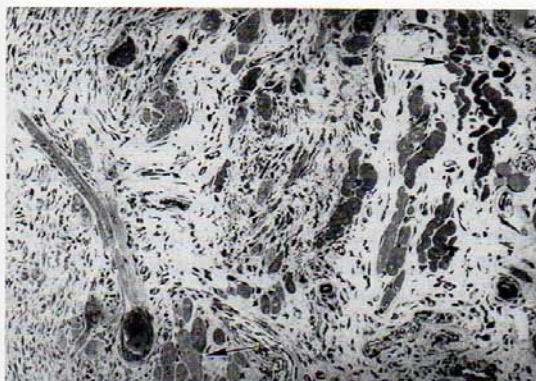


Fig. 32.5 • Área de deficiente regeneración en músculo de ratón dos semanas después de la inyección de 50 μ g de veneno de *Bothrops asper*. Se observan escasas células musculares regenerativas, muy pequeñas, inmersas en tejido fibrótico (flechas). El proceso regenerativo no se ha desarrollado normalmente y predomina la fibrosis.

cas (que afectan los vasos sanguíneos). Dado que la presencia de una vasculatura intacta y de una adecuada perfusión constituye uno de los requisitos para que ocurra una buena regeneración muscular, es evidente que la acción de las toxinas hemorrágicas afecta drásticamente la regeneración muscular, tal y como ha sido corroborado con la metaloproteínasa hemorrágica BaH1 del veneno de *B. asper*⁵⁶.

MIONECROSIS INDUCIDA POR ISQUEMIA

Además de la lesión muscular directa causada por la acción de las miotoxinas, se ha propuesto que los venenos de serpientes de la familia Viperidae también inducen necrosis muscular como consecuencia de la isquemia que se desencadena en el tejido muscular producto de las serias alteraciones vasculares como hemorragia, trombosis, lesiones en la pared arterial y desarrollo de síndrome compartimental. Se ha demostrado claramente que ocurre mionecrosis luego de la inyección en ratones de metaloproteinasas hemorrágicas aisladas de los venenos de *Bothrops jararaca* y *B. asper*^{21-23,56}. Se ha propuesto que esta mionecrosis ocurre como consecuencia de la isquemia tisular ya que se desencadena al cabo de varias horas después de la hemorragia.

Por otra parte, las alteraciones vasculares, causantes de edema y hemorragia, son responsables del gran aumento en el volumen del líquido intersticial, con el consecuente aumento de la presión intracompartimental, la cual lleva, en casos severos, al desarrollo de un síndrome compartimental. También en este caso se genera necrosis del tejido muscular de regiones anatómicas distales debido a la isquemia.

MIONECROSIS INDUCIDA POR EL VENENO DE LA CASCABEL SUDAMERICANA *CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS*

En la década de 1980 quedó claramente establecido que los envenenamientos por la cascabel sudamericana *Crotalus durissus terrificus* se caracterizaban, además del efecto neurotóxico, por un pronunciado efecto miotóxico sistémico⁷. La principal diferencia de este cuadro con el inducido por otros venenos de vipéridos latinoamericanos es que en los accidentes por *Bothrops*, *Lachesis* y otras especies de *Crotalus*, la mionecrosis es de tipo local, mientras que en el caso de *C. d. terrificus* es sistémica, generando un cuadro de rbdomiolisis con mialgias y mioglobulinuria, responsable de insuficiencia renal aguda en algunos casos^{7,8}. Este cuadro se acompaña de una elevación drástica de los niveles séricos de enzimas del citosol de las células musculares, tales como la creatina kinasa (CK) y de hiperkalemia. Esta miotoxicidad es causada por la toxina crotóxina⁵⁷, que es una fosfolipasa A₂ neurotóxica y miotóxica compuesta por dos subunidades, una fosfolipasa A₂ básica y una subunidad ácida más pequeña, denominada subunidad A o crotapotina, la cual desempeña el papel de molécula "chaperona", impidiendo la unión de la subunidad básica a sitios inespecíficos y dirigiéndola a los albos celulares relevantes desde el punto de vista farmacológico⁵⁸.

Además de la crotóxina, los venenos de ejemplares de *C. d. terrificus* de algunas regiones presentan el polipéptido crotamina, de 42 aminoácidos, el cual carece de actividad enzimática⁵⁹. La crotamina induce contractura de células musculares como consecuencia de la acción sobre los canales de sodio dependientes del voltaje de la membrana plasmática de la célula muscular esquelética⁵⁹. Como consecuencia ocurre despolarización, contractura y aumento del volumen intracelular que se refleja en dilatación del retículo sarcoplásmico⁶⁰. Sin embargo, la mionecrosis sistémica observada en los envenenamientos por esta subespecie de cascabel se debe fundamentalmente a la acción de la crotóxina y no de la crotamina.

INFECCIONES

Con bastante frecuencia, las alteraciones locales del envenenamiento por serpientes de la familia Viperidae en América Latina se complican con el desarrollo de infecciones secundarias que se manifiestan con la formación de abscesos^{2,61}. Estudios bacteriológicos han demostrado que las bacterias cultivadas a partir de material de lesión

nes corresponden claramente con las bacterias aisladas del veneno y la cavidad oral de las serpientes, sugiriendo que las infecciones son causadas por microorganismos presentes en el veneno, entre los que destacan una serie de enterobacterias y algunas bacterias anaerobias⁶²⁻⁶⁴. La frecuencia de estas infecciones justifica la antibioterapia que frecuentemente se asocia al tratamiento del envenenamiento ofídico²⁻⁴.

RESPUESTA INFLAMATORIA

Los venenos de serpientes de la familia Viperidae poseen una potente acción inflamotogénica, la cual se manifiesta fundamentalmente por un edema marcado, dolor y un infiltrado leucocitario considerable, en los tejidos afectados. Por otra parte, los venenos de serpientes de la familia Elapidae en América (*Micrurus* spp), por lo general, poseen una acción inflamotogénica mucho menor⁶⁵⁻⁶⁷.

La respuesta inflamatoria que se desarrolla en los envenenamientos reviste interés clínico, dado que puede contribuir significativamente al daño tisular causado por la acción directa de los componentes del veneno. Por ejemplo, una de las consecuencias del edema es la compresión tisular^{4,68}, que puede agravar las condiciones isquémicas del tejido expuesto al veneno. Asimismo, la pérdida de fluido intravascular causada por el edema, cuando este es de una magnitud considerable, puede contribuir al efecto hipovolémico e hipotensivo de los venenos, lo que a su vez puede desencadenar un choque cardiovascular.

Por otra parte, el conocimiento sobre el papel de las células del infiltrado inflamatorio que caracteriza el envenenamiento, así como de las células residentes y sus distintos mediadores químicos, es un campo que apenas comienza a ser estudiado, y que podría tener implicaciones clínicas importantes. La naturaleza dual de la respuesta inflamatoria, con mecanismos que participan tanto en acciones nocivas como beneficiosas para el organismo, podría manifestarse también en el envenenamiento ofídico. Por ejemplo, después del daño tisular local causado por venenos, algunos modelos experimentales indican que se pueden activar distintos procesos conducentes, por una parte, a una adecuada regeneración muscular, o alternativamente, a una cicatrización o reparación del tejido sin regeneración funcional^{43,55,69}. Es evidente que los mecanismos inflamatorios deben de jugar un papel en estos procesos, por lo que su conocimiento detallado podría resultar en mejoras significativas en el tratamiento de las mordeduras de serpiente.

EL EDEMA

La actividad edematizante (o edematígena) de los venenos de vipéridos es muy potente, lo cual se evidencia tanto en casos clínicos, como en modelos experimentales. En estos últimos, las dosis de veneno requeridas para inducir un efecto apreciable (por ejemplo, un aumento del 30% en el peso o el volumen del miembro inyectado), se ubican en el ámbito de unos pocos microgramos, o aún de décimas de microgramo⁷⁰⁻⁷³. El edema inducido por los venenos se caracteriza por ser de aparición inmediata, pudiendo alcanzar un máximo en lapsos tan breves como 15-30 minutos^{70,72,74}.

Adicionalmente al aumento de la permeabilidad microvascular causado por los componentes edematizantes del veneno, puede agregarse la extravasación de sangre, debida a la acción destructiva de las hemorraginas sobre la microvasculatura. En estudios experimentales con el veneno crudo de *Bothrops asper* en el modelo de la almohadilla plantar del ratón, se ha encontrado que esta combinación de edema y hemorragia depende de la dosis inyectada. Dosis bajas del veneno, por ejemplo de alrededor de 1µg, inducen un edema inmediato y transitorio en la extremidad inyectada (Fig. 32.6), en ausencia de hemorragia. En cambio, dosis mayores del veneno, tales como 25-100µg, inducen un edema de similar magnitud y rapidez al anterior, pero sostenido por períodos de hasta 48-72 horas (Fig. 32.6), junto con una marcada hemorragia⁷². Estos hallazgos sugieren que la duración del edema, y su subsiguiente normalización, podrían estar asociadas con la magnitud de las lesiones microvasculares causadas por las hemorraginas del veneno.

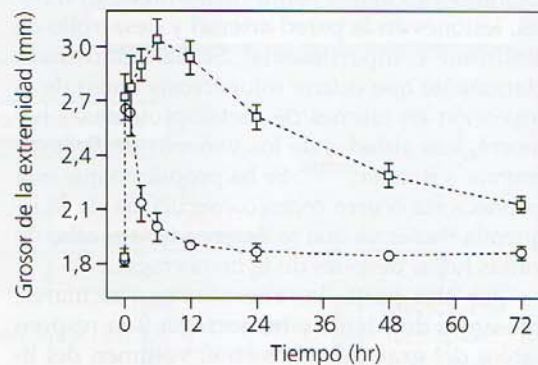


Fig. 32.6 • Desarrollo del edema en la almohadilla plantar del ratón, posterior a la inyección del veneno de *Bothrops asper*, en dosis de 1µg (O) o 50µg (□). El edema se estimó con base en el aumento del grosor de la extremidad inyectada. Cada punto representa el promedio ± desviación estándar de grupos de cinco ratones.

A nivel clínico, el edema local es también de aparición inmediata, y, dependiendo del grado de envenenamiento, puede extenderse distalmente desde la zona de la mordedura, llegando a abarcar áreas considerables de una extremidad o región, durante períodos prolongados^{61,75-78}.

Utilizando técnicas de microscopía intravital, se ha investigado la actividad edematizante del veneno crudo de *B. asper* en el modelo del músculo cremaster de ratón, con el fin de identificar a los segmentos de la microvasculatura cuya permeabilidad es mayormente afectada, así como caracterizar la dinámica del proceso. Mediante la inyección intravenosa de dextrán marcado con fluoresceína, y posterior visualización del tejido bajo el microscopio de fluorescencia, es posible observar el escape de dicho marcador hacia el espacio intersticial, por el aumento de la permeabilidad de los vasos. En el tejido expuesto al veneno, se observa el inicio de este proceso desde los 2 minutos, con una considerable salida del marcador a los 5-6 min. Las vénulas postcapilares, junto con sus segmentos capilares adyacentes, se visualizan como los principales sitios del escape de fluidos inducido por dicho veneno¹⁹.

Los componentes potencialmente responsables del edema en los venenos crudos de distintos vipéridos son de naturaleza bioquímica muy variada: desde aminas biogénicas preformadas del tipo de la histamina, hasta pequeños péptidos, o proteínas como las fosfolipasas A₂, esterasas, proteasas, enzimas liberadoras de kinina (kalikreínas, kininogenasas), y lectinas⁷⁹⁻⁸⁶. Son necesarios los estudios sobre aislamiento y caracterización de factores edematizantes de los venenos de vipéridos de mayor relevancia en Latinoamérica, dado que las investigaciones sobre el edema han sido realizadas fundamentalmente con venenos crudos. La gran heterogeneidad bioquímica de los factores edematizantes hallados en otras especies de la familia Viperidae, principalmente del bloque continental Euroasiático, sugiere que los mecanismos por los cuales los venenos inducen edema son múltiples. De hecho, la diversidad de mecanismos y mediadores involucrados en la inducción del edema, se ha observado no solo con venenos crudos, sino incluso utilizando componentes purificados^{87,88}, lo que refuerza el concepto de que el edema es un efecto complejo, de origen multifactorial.

La mayoría de los componentes edematígenos de los venenos probablemente generan inflamación de un modo indirecto, liberando o

induciendo una variedad de autacoides en el organismo. Además de esto, cabe la posibilidad de que algunos componentes del veneno ejerzan una acción directa sobre las células endoteliales de la microcirculación. Se ha demostrado que algunas toxinas moderadamente edematizantes, como las fosfolipasas A₂ miotóxicas de los venenos botrópicos, son capaces de causar citotoxicidad directa sobre células endoteliales en cultivo²⁹. Por otra parte, las hemorraginas inducen alteraciones drásticas en las células endoteliales *in vivo*, claramente observables mediante microscopía electrónica (ver sección sobre hemorragia). En dosis sub-hemorrágicas, no se ha evaluado experimentalmente la contribución que pueden tener las hemorraginas en la formación del edema.

Hay amplia evidencia de que distintos autacoides son liberados o inducidos por los venenos y algunos de sus componentes purificados. Por ejemplo, se ha demostrado que muchos venenos son capaces de liberar histamina de preparaciones de tejidos animales⁸⁹, o de células del exudado peritoneal⁹⁰. La histamina, así como otras aminas biogénicas relacionadas, podrían ser las responsables de la fase inmediata de aumento de la permeabilidad microvascular, vía receptores H₁ en las células endoteliales^{91,92}. La observación de que algunos venenos o sus componentes son capaces de inducir la degranulación de los mastocitos *in vitro* e *in vivo*^{84,93,94} apoya la posibilidad de que las aminas vasoactivas participen en el edema. Sin embargo, algunas evaluaciones farmacológicas sobre el papel de la histamina en el envenenamiento experimental, utilizando los venenos crudos de *Bothrops jararaca*⁷⁰ y de *B. asper*⁷³ en combinación con drogas antagonistas de los receptores H₁, sugieren una relevancia marginal de este mediador en la inducción del edema. Otros estudios describen la eficacia de los bloqueadores del receptor H₁ en la actividad de incremento de la permeabilidad capilar de ciertos venenos, como el de *Crotalus scutulatus*⁹⁵ y *Trimeresurus flavoviridis*⁹⁶. Esto sugiere la existencia de diferencias importantes en los mecanismos de generación de edema entre distintos venenos, lo cual plantea un importante obstáculo para el establecimiento de esquemas terapéuticos generales.

Otros mediadores de la inflamación juegan un papel en las etapas posteriores o tardías del edema⁹¹. Estos incluyen la bradikinina, las prostaglandinas, los leucotrienos y los tromboxanos, entre otros. La bradikinina, un potente péptido con actividad hipotensora, inductora de dolor,

puede ser generada por la acción de venenos ofídicos^{89,97-100}. Sin embargo, su papel en la generación del edema durante el envenenamiento no ha sido caracterizado.

La inducción de tromboxano A₂ y leucotrieno B₄ en la respuesta inflamatoria inducida experimentalmente por el veneno de *Bothrops jararaca* en ratas¹⁰¹, o por fosfolipasas del veneno de *Vipera russelli* en cobayos¹⁰², ha sido demostrada. El papel de los eicosanoides derivados del ácido araquidónico durante el desarrollo del edema también ha sido sugerido con base en estudios de inhibición de este efecto con diversas drogas^{70,73,103}.

Finalmente, la posible activación del sistema de complemento es otro factor de potencial contribución en el edema causado por venenos, así como en otros aspectos de la respuesta inflamatoria¹⁰⁴, aunque existe muy poca información sobre su participación durante el envenenamiento. La depleción del complemento en ratones mediante el uso del "factor del veneno de cobra (CVF)" no afectó la magnitud ni la duración del edema inducido por la miotoxina II del veneno de *B. asper*¹⁰⁵.

Como se ha expuesto, el origen multifactorial del edema en el envenenamiento, la complejidad de los mecanismos que participan en este efecto, y la diversidad de acciones que pueden presentar los venenos de distintas especies de serpientes, representa un obstáculo importante para el abordaje terapéutico. Es difícil lograr inhibiciones significativas del edema con fármacos individuales⁷⁰, y por otra parte, la capacidad neutralizante de los antivenenos hacia la acción edematígena de los venenos es muy limitada¹⁰⁶⁻¹⁰⁹. Por lo anterior, es relevante realizar estudios detallados sobre este efecto, tanto básicos (comprensión de los mecanismos involucrados en el edema), como clínicos (evaluación de distintos fármacos antagonistas y sus combinaciones).

HYPERALGESIA

El intenso dolor local es una de las características principales de los envenenamientos por serpientes de la familia Viperidae^{3,4}. El efecto hiperalgésico ha sido estudiado experimentalmente en ratas con los venenos de *B. jararaca* y *B. asper*^{110,111}. En ambos venenos el efecto hiperalgésico apareció rápidamente después del envenenamiento y persistió durante varias horas. En el caso de *B. jararaca* se demostró que este efecto es mediado principalmente por prostaglandinas, leucotrienos y factor activador de plaquetas (PAF)¹¹⁰. Por otra parte, en el caso de *B. asper*, el

efecto hiperalgésico es mediado por bradikina, por la acción de fosfolipasas A₂ y por leucotrienos¹¹¹. En ambos estudios se observó una clara disociación entre los mediadores responsables por la hiperalgésia y aquellos responsables del edema en ambos venenos.

CÉLULAS DEL INFILTRADO INFLAMATORIO

Los tejidos dañados por los distintos componentes del veneno que ejercen una acción local, principalmente miotoxinas y hemorraginas, son rápidamente infiltrados por leucocitos. Al igual que en otros procesos agudos, durante el envenenamiento las primeras células en extravasar son los polimorfonucleares neutrófilos, los cuales aparecen en los tejidos lesionados desde las primeras horas, en modelos animales que han utilizado venenos botrópicos¹⁰. El infiltrado celular puede alcanzar un máximo entre 6 y 72 horas, con un predominio inicial de neutrófilos que es gradualmente desplazado por la aparición de células mononucleares, los monocitos y linfocitos^{10,101}. Flores *et al.* (1993)¹⁰³ han sugerido que las fosfolipasas A₂ de los venenos de *Bothrops alternatus* y *B. erythromelas* podrían ser responsables de la migración de neutrófilos *in vivo*, utilizando el modelo de la cavidad peritoneal en ratas. Por otra parte, se ha demostrado que, *in vitro*, el veneno de *B. jararaca* no es quimiotáctico *per se* para los leucocitos, resaltando la importancia de los mediadores de respuesta inflamatoria en el proceso de infiltración celular¹⁰¹. En el caso del veneno de *B. asper*, se ha demostrado que la activación del complemento juega un papel fundamental en el reclutamiento de leucocitos *in vivo*, a través de la generación de factores quimiotácticos¹¹². Mediante microscopía intravital, se ha observado un aumento marcado en el rodamiento (*rolling*), marginación, y adherencia de leucocitos al endotelio venular, desde unos pocos minutos después de la aplicación *in vivo* del veneno de *B. asper*¹⁹ o una de sus hemorraginas purificadas²³.

Las células del infiltrado inflamatorio son una fuente importante de mediadores, cuyo papel en el daño tisular o, alternativamente, en la reparación o regeneración tisular posteriores al envenenamiento, es aún poco conocido. Entre estos potentes mediadores de la inflamación se encuentran las citocinas, producidas no solo por los leucocitos del infiltrado, sino también por las células residentes en los tejidos lesionados. Los primeros estudios experimentales enfocados hacia la posible participación de citocinas durante el envenenamiento ofídico fue-

ron realizados en el ratón, con el veneno de *B. asper*, el cual causó una rápida inducción de interleukina-6 (IL-6) detectable sistémicamente desde la primera hora⁷². La respuesta de IL-6 se encontró también al inyectar, independientemente, una miotoxina o una hemorragina purificadas, lo cual sugiere que la producción de esta citokina obedece al daño tisular, dando inicio a una respuesta de fase aguda¹⁰⁵. Estos hallazgos han sido posteriormente confirmados en pacientes mordidos por *Bothrops* spp y *Crotalus durissus terrificus* en Brasil, en quienes se encontró no solo elevaciones de IL-6 sérica, sino también de IL-8¹¹³, una citokina con potente acción quimiotáctica. Barros *et al.* (1998)¹¹⁴ hallaron que, en el ratón, el veneno de *B. atrox* induce la producción de IL-6, IL-10, interferón gama (IFN- γ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y óxido nítrico (NO). Petricevich *et al.* (2000)¹¹⁵ observaron que la inyección intraperitoneal en camundongos de una Dosis Letal 50% de los venenos de *B. asper* y *B. jararaca* indujo una elevación de los niveles séricos de TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10, IFN- γ y NO. El papel que juegan estos mediadores en la patogénesis del envenenamiento no ha sido aún establecido. Sin embargo, su potencial relevancia ha sido demostrada por Moura-da-Silva *et al.* (1996)¹¹⁶, en cuyos estudios la administración de anticuerpos contra el TNF- α disminuyó significativamente la magnitud de la lesión dromonecrotica causada por el veneno de *Echis pyramidum leakeyi* en ratas. Estos novedosos hallazgos abren la posibilidad de interferir con

el daño tisular local y los efectos sistémicos de los venenos, no solo mediante la tradicional neutralización serológica de sus componentes, sino también, en un futuro, mediante la modulación de algunos de los mediadores inflamatorios producidos por la víctima.

CONCLUSION

Los efectos locales del envenenamiento por víperidos en América Latina constituyen un componente de gran importancia en la fisiopatología de los mismos. Las investigaciones realizadas dejan ver claramente que se trata de un cuadro muy complejo, en el que participan e interactúan una serie de toxinas y en el que se desencadenan mecanismos endógenos. La Fig. 32.7 integra lo expuesto en este capítulo. Indudablemente permanecen una gran cantidad de incógnitas en relación con la patogénesis de estos efectos, lo cual constituye un reto para la investigación toxicológica en América Latina. Es evidente que una mejor comprensión de este aspecto del envenenamiento ofídico nos llevará a nuevos y más eficientes recursos terapéuticos.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo de los investigadores, estudiantes y asistentes del Instituto Clodomiro Picado, así como el financiamiento de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, la *International Foundation for Science (IFS)*, la *Agency for International Development (AID)*, y la *Swedish Agency for Research Cooperation with Developing Countries (SAREC)*.

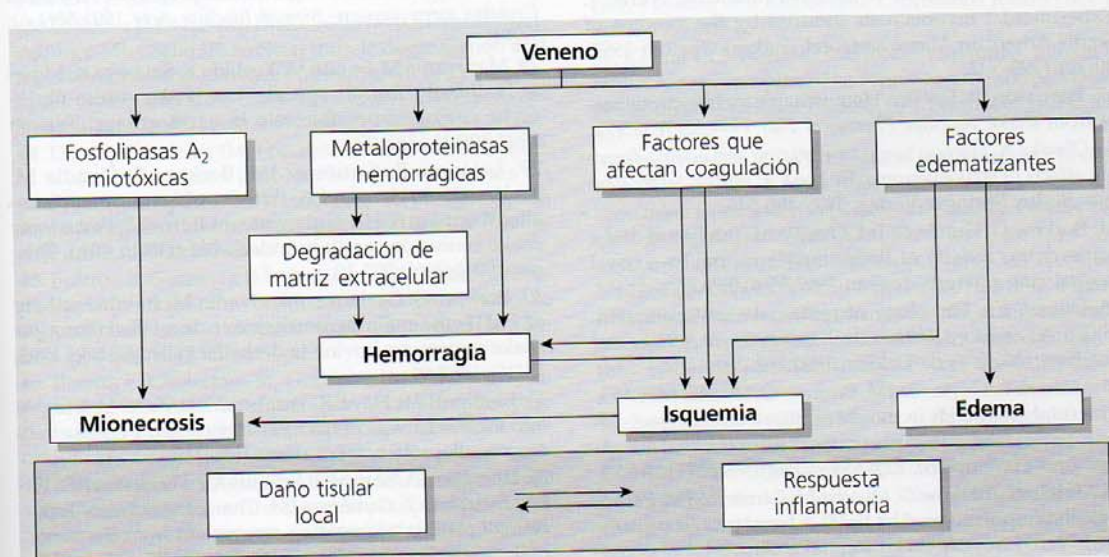


Fig. 32.7 • Hipótesis sobre el desarrollo de efectos locales inducidos por venenos de serpientes de la familia Viperidae.

• • • • •

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bolanos R. Las serpientes venenosas de Centroamérica y el problema del ofidismo. Aspectos zoológicos, epidemiológicos y biomédicos. *Rev Cost Cienc Méd* 1982;3:165-84.
2. Otero R, Tobón GS, Gómez LF. Accidente ofídico en Antioquia y Chocó. Aspectos clínicos y epidemiológicos (marzo de 1989-febrero de 1990). *Acta Méd Colombiana* 1992;17:229-49.
3. Fan HW, Cardoso JLC. Clinical toxicology of snake bites in South America. In: Meier J, White J, editors. *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons*. Boca Raton: CRC Press, 1995:667-88.
4. Gutiérrez JM. Clinical toxicology of snake bites in Central America. In: Meier J, White J, editors. *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons*. Boca Raton: CRC Press, 1995:645-65.
5. Otero R. Manual de Diagnóstico y Tratamiento del Accidente Ofídico. Editorial Universidad de Antioquia, Medellín 1994.
6. Rosenfeld G. Symptomatology, pathology, and treatment of snake bites in South America. In: Bucherl W, Buckley EE, Deulofeu V, editors. *Venomous animals and their venoms*. New York: Academic Press, 1971:345-841.
7. Azevedo-Marques MM, Cupo P, Coimbra TM, Hering SE, Rossi MA, Laure CJ. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. *Toxicon* 1985;23(4):631-6.
8. Azevedo-Marques MM, Hering SE, Cupo P. Evidence that *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) envenomation in humans causes myolysis rather than hemolysis. *Toxicon* 1987;25(11):1163-8.
9. Vital Brazil O. Coral snake venoms: mode of action and pathophysiology of experimental pathenomination (1). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1987;29(3):119-26.
10. Gutiérrez JM, Chaves F, Cerdas L. Inflammatory infiltrate in skeletal muscle injected with *Bothrops asper* venom. *Rev Biol Trop* 1986b;34(2):209-14.
11. Gutiérrez JM, Rojas G, da Silva Junior NJ, Nunez J. Experimental myonecrosis induced by the venoms of South American *Micrurus* (coral snakes). *Toxicon* 1992;30(10):1299-302.
12. Bjarnason JB, Fox JW. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol Ther* 1994;62(3):325-72.
13. Ohsaka A. Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms. In: Lee CY, editor. *Snake Venoms*. Berlin: Springer Verlag, 1979:480-546.
14. Borkow G, Gutiérrez JM, Ovadia M. Inhibition of the hemorrhagic activity of *Bothrops asper* venom by a novel neutralizing mixture. *Toxicon* 1997;35(6):865-77.
15. Ownby CL. Pathology of rattlesnake envenomation. In: Tu AT, editor. *Rattlesnake Venoms, Their Actions and Treatment*. New York: Dekker, 1982:163-209.
16. Moreira L, Gutiérrez JM, Borkow G, Ovadia M. Ultrastructural alterations in mouse capillary blood vessels after experimental injection of venom from the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). *Exp Mol Pathol* 1992;57(2):124-33.
17. Moreira L, Borkow G, Ovadia M, Gutiérrez JM. Pathological changes induced by BaH1, a hemorrhagic proteinase isolated from *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom, on mouse capillary blood vessels. *Toxicon* 1994;32(8):976-87.
18. Ownby CL, Gutiérrez JM, Colberg TR, Odell GV. Quantitation of myonecrosis induced by myotoxin a from prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. *Toxicon* 1982;20(5):877-85.
19. Lomonte B, Lundgren J, Johansson B, Bagge U. The dynamics of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom and myotoxin II on the mouse cremaster muscle: an intravital and electron microscopic study. *Toxicon* 1994a;32(1):41-55.
20. Homma M, Tu AT. Morphology of local tissue damage in experimental snake envenomation. *Br J Exp Pathol* 1971;52(5):538-42.
21. Queiroz LS, Santo Neto H, Assakura MT, Reichl AP, Mandelbaum FR. Muscular lesions induced by a hemorrhagic factor from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Braz J Med Biol Res* 1985;18(3):337-40.
22. Queiroz LS, Santo Neto H, Assakura MT, Reichl AP, Mandelbaum FR. Pathological changes in muscle caused by haemorrhagic and proteolytic factors from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon* 1985;23(2):341-5.
23. Rucavado A, Lomonte B, Ovadia M, Gutiérrez JM. Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom. *Exp Mol Pathol* 1995;63(3):186-99.
24. Ownby CL, Bjarnason J, Tu AT. Hemorrhagic toxins from rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. Pathogenesis of hemorrhage induced by three purified toxins. *Am J Pathol* 1978;93(1):201-18.
25. Ownby CL, Nika T, Imai K, Sugihara H. Pathogenesis of hemorrhage induced by bilitoxin, a hemorrhagic toxin isolated from the venom of the common cantil (*Agkistrodon bilineatus bilineatus*). *Toxicon* 1990;28(7):837-46.
26. Goncalves LR, Mariano M. Local haemorrhage induced by *Bothrops jararaca* venom: relationship to neurogenic inflammation. *Mediators Inflamm* 2000;9(2):101-7.
27. Baramova EN, Shannon JD, Fox JW, Bjarnason JB. Proteolytic digestion of non-collagenous basement membrane proteins by the hemorrhagic metalloproteinase Ht-e from *Crotalus atrox* venom. *Biomed Biochim Acta* 1991;50(4-6):763-8.
28. Maruyama M, Sugiki M, Yoshida E, Shimaya K, Mihaara H. Broad substrate specificity of snake venom fibrinolytic enzymes: possible role in haemorrhage. *Toxicon* 1992;30(11):1387-97.
29. Lomonte B, Gutiérrez JM, Borkow G, Ovadia M, Tarkowski A, Hanson LA. Activity of hemorrhagic metalloproteinase BaH-1 and myotoxin II from *Bothrops asper* snake venom on capillary endothelial cells in vitro. *Toxicon* 1994b;32(4):505-10.
30. Borkow G, Gutiérrez JM, Ovadia M. In vitro activity of BaH1, the main hemorrhagic toxin of *Bothrops asper* snake venom on bovine endothelial cells. *Toxicon* 1995;33(10):1387-91.
31. Kamiguti AS, Hay CR, Theakston RD, Zuzel M. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. *Toxicon* 1996;34(6):627-42.
32. Rucavado A, Soto M, Kamiguti AS, Theakston RD, Fox JW, Escalante T, Gutiérrez JM. Characterization of aspercetin, a platelet aggregating component from the venom of the snake *Bothrops asper* which induces thrombocytopenia and potentiates metalloproteinase-induced hemorrhage. *Thromb Haemost* 2001;85(4):710-5.

33. Gutiérrez JM, Lomonte B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 1995;33(11):1405-24.
34. Gutiérrez JM, Lomonte B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: Kini RM, editor. *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism*. Chichester: John Wiley & Sons, 1997:321-52.
35. Kaiser, II, Gutiérrez JM, Plummer D, Aird SD, Odell GV. The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. *Arch Biochem Biophys* 1990;278(2):319-25.
36. Francis B, Gutiérrez JM, Lomonte B, Kaiser, II. Myotoxin II from *Bothrops asper* (Terciopelo) venom is a lysine-49 phospholipase A₂. *Arch Biochem Biophys* 1991;284(2):352-9.
37. Cintra AC, Marangoni S, Oliveira B, Giglio JR. Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. *J Protein Chem* 1993;12(1):57-64.
38. Arni RK, Ward RJ, Cintra AC, Giglio JR. Crystallization and preliminary diffraction data of bothropstoxin I isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. *Toxicon* 1995;33(3):383-6.
39. Soares AM, Andriao-Escarso SH, Angulo Y, Lomonte B, Gutiérrez JM, Marangoni S, Toyama MH, Arni RK, Giglio JR. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A(2) homologue from *Bothrops moojeni* (Caissaca) snake venom. *Arch Biochem Biophys* 2000a;373(1):7-15.
40. Soares AM, Guerra SiqmR, Borja-Oliveira CR, Rodrigues VM, Rodrigues-Simioni L, Rodrigues V, Fontes MR, Lomonte B, Gutiérrez JM, Giglio JR. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A(2) homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. *Arch Biochem Biophys* 2000b;378(2):201-9.
41. Gutiérrez JM, Ownby CL, Odell GV. Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. *Exp Mol Pathol* 1984a;40(3):367-79.
42. Gutiérrez JM, Chaves F, Gene JA, Lomonte B, Camacho Z, Schosinsky K. Myonecrosis induced in mice by a basic myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops nummifer* (jumping viper) from Costa Rica. *Toxicon* 1989;27(7):735-45.
43. Gutiérrez JM, Nunez J, Diaz C, Cintra AC, Homs-Brandeburgo MI, Giglio JR. Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin-II, a phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. *Exp Mol Pathol* 1991;55(3):217-29.
44. Diaz C, Gutiérrez JM, Lomonte B, Gene JA. The effect of myotoxins isolated from *Bothrops* snake venoms on multilamellar liposomes: relationship to phospholipase A₂, anticoagulant and myotoxic activities. *Biochim Biophys Acta* 1991;1070(2):455-60.
45. Bultron E, Gutiérrez JM, Thelestam M. Effects of *Bothrops asper* (terciopelo) myotoxin III, a basic phospholipase A₂, on liposomes and mouse gastrocnemius muscle. *Toxicon* 1993;31(2):217-22.
46. Butron E, Ghelestam M, Gutiérrez JM. Effects on cultured mammalian cells of myotoxin III, a phospholipase A₂ isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) venom. *Biochim Biophys Acta* 1993;1179(3):253-9.
47. Lomonte B, Tarkowski A, Hanson LA. Broad cytolytic specificity of myotoxin II, a lysine-49 phospholipase A₂ of *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 1994c;32(11):1359-69.
48. Brenes F, Gutiérrez JM, Lomonte B. Immunohistochemical demonstration of the binding of *Bothrops asper* myotoxin to skeletal muscle sarcolemma. *Toxicon* 1987;25(5):574-7.
49. Lomonte B, Moreno E, Tarkowski A, Hanson LA, Maccarana M. Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a lysine 49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. *J Biol Chem* 1994d;269(47):29867-73.
50. Diaz-Oreiro C, Gutiérrez JM. Chemical modification of histidine and lysine residues of myotoxic phospholipases A₂ isolated from *Bothrops asper* and *Bothrops godmani* snake venoms: effects on enzymatic and pharmacological properties. *Toxicon* 1997;35(2):241-52.
51. Trump BF, Berezsky IK. Calcium-mediated cell injury and cell death. *Faseb J* 1995;9(2):219-28.
52. Gutiérrez JM, Ownby CL, Odell GV. Skeletal muscle regeneration after myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin from the snake *Bothrops asper* (Fer-de-Lance). *Toxicon* 1984b;22(5):719-31.
53. Gutiérrez JM, Arce V, Brenes F, Chaves F. Changes in myofibrillar components after skeletal muscle necrosis induced by a myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Exp Mol Pathol* 1990;52(1):25-36.
54. Queiroz LS, Santo Neto H, Rodrigues-Simioni L, Prado-Franceschi J. Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon* 1984;22(3):339-46.
55. Arce V, Brenes F, Gutiérrez JM. Degenerative and regenerative changes in murine skeletal muscle after injection of venom from the snake *Bothrops asper*: a histochemical and immunocytochemical study. *Int J Exp Pathol* 1991;72(2):211-26.
56. Gutiérrez JM, Romero M, Nunez J, Chaves F, Borkow G, Ovadia M. Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of BaH1, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). *Exp Mol Pathol* 1995;62(1):28-41.
57. Gopalakrishnakone P, Dempster DW, Hawgood BJ, Elder HY. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A₂ complex. *Toxicon* 1984;22(1):85-98.
58. Bon C. Multicomponent neurotoxic phospholipases A₂. In: Kini RM, editor. *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism*. Chichester: John Wiley & Sons, 1997:269-85.
59. Chang CC, Tseng KH. Effect of crotamine, a toxin of South American rattlesnake venom, on the sodium channel of murine skeletal muscle. *Br J Pharmacol* 1978;63(3):551-9.
60. Cameron DL, Tu AT. Chemical and functional homology of myotoxin a from prairie rattlesnake venom and crotamine from South American rattlesnake venom. *Biochim Biophys Acta* 1978;532(1):147-54.
61. Cardoso JL, Fan HW, Franca FO, Jorge MT, Leite RP, Nishioka SA, Avila A, Sano-Martins IS, Tomy SC, Santoro ML, et al. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. *Q J Med* 1993;86(5):315-25.
62. Arroyo O, Bolanos R, Munoz G. The bacterial flora of venoms and mouth cavities of Costa Rican snakes. *Bull Pan Am Health Organ* 1980;14(3):280-5.
63. Jorge MT, de Mendonca JS, Ribeiro LA, da Silva ML, Kusano EJ, Cordeiro CL. Flora bacteriana da cavidade oral, presas e veneno de *Bothrops jararaca*: possível fonte de infecção no local da picada. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1990;32(1):6-10.

64. Jorge MT, Ribeiro LA, da Silva ML, Kusano EJ, de Mendonça JS. Microbiological studies of abscesses complicating *Bothrops* snakebite in humans: a prospective study. *Toxicon* 1994;32(6):743-8.
65. Gutiérrez JM, Lomonte B, Portilla E, Cerdas L, Rojas E. Local effects induced by coral snake venoms: evidence of myonecrosis after experimental inoculations of venoms from five species. *Toxicon* 1983;21(6):777-83.
66. Coelho LK, Silva E, Esposito C, Zanin M. Clinical features and treatment of Elapidae bites: report of three cases. *Hum Exp Toxicol* 1992;11(2):135-7.
67. Tambourgi DV, dos Santos MC, Furtado Mde F, de Freitas MC, da Silva WD, Kipnis TL. Pro-inflammatory activities in elapid snake venoms. *Br J Pharmacol* 1994;112(3):723-7.
68. Garfin SR, Castilonia RR, Mubarak SJ, Hargens AR, Akesson WH, Russell FE. The effect of antivenin on intramuscular pressure elevations induced by rattlesnake venom. *Toxicon* 1985;23(4):677-80.
69. Gutiérrez JM, Chaves F, Mata E, Cerdas L. Skeletal muscle regeneration after myonecrosis induced by *Bothrops asper* (terciopelo) venom. *Toxicon* 1986;24(3):223-31.
70. Trebien HA, Calixto JB. Pharmacological evaluation of rat paw oedema induced by *Bothrops jararaca* venom. *Agents Actions* 1989;26(3-4):292-300.
71. Tan NH, Saifuddin MN. Comparative study of the edema-inducing activity of snake venoms. *Comp Biochem Physiol C* 1990;97(2):293-6.
72. Lomonte B, Tarkowski A, Hanson LA. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. *Inflammation* 1993;17(2):93-105.
73. Chaves F, Barboza M, Gutiérrez JM. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. *Toxicon* 1995;33(1):31-9.
74. Soares de Moura R, Aguiar AS, Melgarejo AR, de Carvalho LC. Pharmacological aspects of mouse hind-paw oedema induced by *Lachesis muta rhombata*. *Toxicon* 1998;36(5):771-80.
75. Kerrigan KR. Venomous snakebite in eastern Ecuador. *Am J Trop Med Hyg* 1991;44(1):93-9.
76. Nishioka SA, Silveira PV. A clinical and epidemiologic study of 292 cases of lance-headed viper bite in a Brazilian teaching hospital. *Am J Trop Med Hyg* 1992;47(6):805-10.
77. Thomas L, Tyburn B, Bucher B, Pecout F, Ketterle J, Rieux D, Smadja D, Garnier D, Plumelle Y. Prevention of thromboses in human patients with *Bothrops lanceolatus* envenoming in Martinique: failure of anticoagulants and efficacy of a monospecific antivenom. Research Group on Snake Bites in Martinique. *Am J Trop Med Hyg* 1995;52(5):419-26.
78. Otero R, Gutiérrez JM, Nunez V, Robles A, Estrada R, Segura E, Toro MF, Garcia ME, Diaz A, Ramirez EC, Gomez G, Castaneda J, Moreno ME. A randomized double-blind clinical trial of two antivenoms in patients bitten by *Bothrops atrox* in Colombia. The Regional Group on Antivenom Therapy Research (REGATHER). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996;90(6):696-700.
79. Mebs D. A comparative study of enzyme activities in snake venoms. *Int J Biochem* 1970;1:335-42.
80. Vargaftig BB, Bhargava N, Bonta IL. Haemorrhagic and permeability increasing effects of '*Bothrops jararaca*' and other Crotalidae venoms as related to amine or kinin release. *Agents Actions* 1974;4(3):163-8.
81. Bjarnason JB, Barish A, Dizenzo GS, Campbell R, Fox JW. Kallikrein-like enzymes from *Crotalus atrox* venom. *J Biol Chem* 1983;258(20):12566-73.
82. Tilmisany AK, Mustafa AA, Abdel Aziz A, Osman OH. Evidence for the presence of histamine in Gaboon viper (*Bitis gabonica*) venom. *Toxicon* 1986;24(11-12):1159-61.
83. Teng CM, Wang JP, Peng HC, Ouyang C. Edema-producing proteins isolated from *Trimeresurus mucrosquamatus* snake venom. *Toxicon* 1989;27(8):899-905.
84. Wang JP, Teng CM. Rat paw oedema and mast cell degranulation caused by two phospholipase A₂ enzymes isolated from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. *J Pharm Pharmacol* 1990;42(12):846-50.
85. Lomonte B, Rojas G, Gutiérrez JM, Ramirez G. Isolation of a galactose-binding lectin from the venom of the snake *Bothrops godmani* (Godmann's pit viper). *Toxicon* 1990;28(1):75-81.
86. Landucci EC, de Castro RC, Toyama M, Giglio JR, Marangoni S, De Nucci G, Antunes E. Inflammatory oedema induced by the lys-49 phospholipase A₂ homologue piratoxin-i in the rat and rabbit. Effect of polyanions and p-bromophenacyl bromide. *Biochem Pharmacol* 2000;59(10):1289-94.
87. Calhoun W, Yu J, Sung A, Chau TT, Marshall LA, Weichman BM, Carlson RP. Pharmacologic modulation of D-49 phospholipase A₂-induced paw edema in the mouse. *Agents Actions* 1989;27(3-4):418-21.
88. Marshall LA, Chang JY, Calhoun W, Yu J, Carlson RP. Preliminary studies on phospholipase A₂-induced mouse paw edema as a model to evaluate anti-inflammatory agents. *J Cell Biochem* 1989;40(2):147-55.
89. Rothschild AM, Rothschild Z. Liberation of pharmacologically active substances by snake venoms. In: Lee CY, editor. *Handbook of Experimental Pharmacology*, v 52, *Snake Venoms*. Berlin: Springer-Verlag, 1979:591-628.
90. Antunes E, Rodrigues-Simioni L, Prado-Franceschi J. Cross-neutralization on the histamine-releasing activity of snake venoms. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam* 1989;39(4):431-8.
91. Trowbridge HO, Emling RC. *Inflammation: a review of the process*. Chicago: Quintessence Publishing, 1989,166p.
92. Atkinson TP, White MV, Kaliner MA. Histamine and serotonin. In: Gallin JL, Goldstein IM, Snyderman R, editors. *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. New York: Raven Press, 1992:193-209.
93. Chiu HF, Chen IJ, Teng CM. Edema formation and degranulation of mast cells by a basic phospholipase A₂ purified from *Trimeresurus mucrosquamatus* snake venom. *Toxicon* 1989;27(1):115-25.
94. Landucci EC, Castro RC, Pereira MF, Cintra AC, Giglio JR, Marangoni S, Oliveira B, Cirino G, Antunes E, De Nucci G. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A₂ homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. *Eur J Pharmacol* 1998;343(2-3):257-63.
95. Miller RA, Tu AT. Factors in snake venoms that increase capillary permeability. *J Pharm Pharmacol* 1989;41(11):792-4.
96. Detrait J, Jacob J. Antagonists of mouse paw oedema induced by Habu snake (*Trimeresurus flavoviridis*) venom. Inhibitions by various antagonists administered alone or in combinations. *Jpn J Exp Med* 1988;58(6):249-59.
97. Rocha e Silva M, Beraldo WT, Rosenfeld G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulins by snake venoms and trypsin. *Amer J Physiol* 1949;156:216-73.
98. Cohen I, Zur M, Kaminsky E, de Vries A. Isolation and characterization of kinin-releasing enzyme of *Echis coloratus* venom. *Biochem Pharmacol* 1970;19(3):785-93.

99. Bonta IL, Vargaftig BB, Böhm GM. Snake venoms as an experimental tool to induce and study models of microvessel damage. In: Lee CY, editor. *Handbook of Experimental Pharmacology*, v 52, *Snake Venoms*. Berlin: Springer-Verlag, 1979:629-83.
100. Bailey GS, al-Joufi A, Rawat S, Smith DC. Neutralization of kinin-releasing enzymes of crotalid venoms by monospecific and polyspecific antivenoms. *Toxicon* 1991; 29(6):777-81.
101. Farsky SH, Walber J, Costa-Cruz M, Curry Y, Teixeira CF. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: in vivo and in vitro studies. *Toxicon* 1997; 35(2):185-93.
102. Huang HC. Release of slow reacting substance from the guinea-pig lung by phospholipases A₂ of *Vipera russelli* snake venom. *Toxicon* 1984;22(3):359-72.
103. Flores CA, Zappellini A, Prado-Franceschi J. Lipoxigenase-derived mediators may be involved in in vivo neutrophil migration induced by *Bothrops erythromelas* and *Bothrops alternatus* venoms. *Toxicon* 1993;31(12):1551-9.
104. Goldstein IM. Complement: biologically active products. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, editors. *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. New York: Raven Press, 1993:63-80.
105. Lomonte B. Tissue damage and inflammation induced by snake venoms [PhD Thesis]. University of Göteborg, 1994.
106. Gutiérrez JM, Chaves F, Bolanos R, Cerdas L, Rojas E, Arroyo O, Portilla E. Neutralización de los efectos locales del veneno de *Bothrops asper* por un antiveneno polivalente. *Toxicon* 1981;19(4):493-500.
107. Gutiérrez JM, Rojas G, Lomonte B, Gene JA, Cerdas L. Comparative study of the edema-forming activity of Costa Rican snake venoms and its neutralization by a polyvalent antivenom. *Comp Biochem Physiol C* 1986d;85(1):171-5.
108. Lomonte B. Edema-forming activity of bushmaster (*Lachesis muta stenophrys*) and Central American rattlesnake (*Crotalus durissus durissus*) venoms and neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon* 1985;23(1):173-6.
109. Rojas G, Gutiérrez JM, Gene JA, Gomez M, Cerdas L. Neutralization of toxic and enzyme activities of 4 venoms from snakes of Guatemala and Honduras by the polyvalent antivenin produced in Costa Rica. *Rev Biol Trop* 1987; 35(1):59-67.
110. Teixeira CF, Cury Y, Oga S, Jancar S. Hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom in rats: role of eicosanoids and platelet activating factor (PAF). *Toxicon* 1994;32(4):419-26.
111. Chacur M, Pico G, Gutiérrez JM, Teixeira CF, Cury Y. Pharmacological modulation of hyperalgesia induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon* 2001;39(8):1173-81.
112. Farsky SH, Goncalves LR, Gutiérrez JM, Correa AP, Rucavado A, Gasque P, Tambourgi DV. *Bothrops asper* snake venom and its metalloproteinase BaP-1 activate the complement system. Role in leukocyte recruitment. *Mediators Inflamm* 2000;9(5):213-21.
113. Barraviera B, Lomonte B, Tarkowski A et al. Acute-phase reactions, including cytokines, in patients bitten by *Bothrops* and *Crotalus* snakes in Brazil. *J Venom Anim Toxins* 1995;1:11-22.
114. Barros SF, Friedlanskaia I, Petricevich VL, Kipnis TL. Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with *Bothrops atrox* venom. *Mediators Inflamm* 1998;7(5):339-46.
115. Petricevich VL, Teixeira CF, Tambourgi DV, Gutiérrez JM. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. *Toxicon* 2000;38(9):1253-66.
116. Moura-da-Silva AM, Laing GD, Paine MJ, Dennison JM, Politi V, Crampton JM, Theakston RD. Processing of pro-tumor necrosis factor-alpha by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. *Eur J Immunol* 1996;26(9):2000-5.